

UPLC 法同时测定金欣口服液中 8 种指标成分

单进军¹, 杜丽娜¹, 徐建亚¹, 徐 珊¹, 狄留庆², 汪受传^{1*}

1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210046

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

摘 要: **目的** 建立 UPLC 法同时测定金欣口服液中芥子碱硫酸盐、虎杖苷、野黄芩苷、白藜芦醇、黄芩苷、大黄素-8-O- β -葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素 8 种指标成分的量。**方法** 采用 UPLC 法, Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 体积流量为 0.4 mL/min, 梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C; 分别对线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率进行了考察。**结果** 被测定的 8 种指标成分分别在选定的范围内线性关系良好, 平均加样回收率 99%~102%, RSD 均小于 4%。**结论** 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于金欣口服液的质量控制。

关键词: 金欣口服液; 多指标成分; UPLC; 白藜芦醇; 黄芩苷; 虎杖苷

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)01-0-0

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.000

Simultaneous determination of eight components in Jinxin Oral Liquid by UPLC

SHAN Jin-jun¹, DU Li-na¹, XU Jian-ya¹, XU Shan¹, DI Liu-qing², WANG Shou-chuan¹

1. The First Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Key words: Jinxin Oral Liquid; multi-index composition; UPLC; resveratrol; baicalin; polydatin

金欣口服液 (原名清肺口服液) 是由黄芩、虎杖、杏仁、葶苈子等药物组成, 根据儿科用药特殊性研制而成的中药 6.1 类新药 (已完成临床研究), 具有宣肺开闭、清热解毒、化痰止咳之功效。临床和实验研究均证实金欣口服液治疗小儿病毒性肺炎疗效肯定, 具有抗病毒、调整免疫功能、抗炎、解热、止咳、化痰、平喘等作用^[1-3]。为进一步提高该制剂的质量标准, 本实验采用梯度洗脱超高效液相色谱法 (UPLC) 同时测定金欣口服液中芥子碱硫酸盐、虎杖苷、野黄芩苷、白藜芦醇、黄芩苷、大黄素-8-O- β -葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素 8 种指标成分的量。实验结果表明, 本法简便、快捷、灵敏、准确, 可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与材料

超高效液相色谱系统 (Acquity UPLC, Waters, 包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower2 工作站); Anke TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

金欣口服液, 按照新药制备工艺自制^[4] (批号 20110318、20110615、20110929); 对照品芥子碱硫酸盐 (111702-200501)、黄芩苷 (110842-200605)、汉黄芩素 (111514-200403) 购于中国食品药品检定研究院, 对照品黄芩素、野黄芩苷、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-O- β -葡萄糖苷均购自四川省维克奇生物科技有限公司, HPLC 检测质量分数均大于 98%; 乙腈、甲酸 (色谱纯), 甲醇 (分析纯), 水 (超纯水)。

收稿日期: 2012-05-04

基金项目: 国家自然科学基金 (81072840); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20093237110006); 江苏省自然科学基金 (BK2010560); 江苏省中医药科技项目 (LZ11183)

作者简介: 单进军 (1979—), 男, 江苏大丰人, 博士, 助理研究员, 研究方向为中医临床有效方药的应用开发及基础研究。

Tel: (025)85811146 E-mail: shanjinjun@njutcm.edu.cn

***通信作者** 汪受传 Tel: (025)86798182 E-mail: wscnj@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~8.5 min, 89%~70% B; 8.5~9 min, 70%~60% B; 9~10.5 min, 60%~50% B; 10.5~12 min, 50%~20% B; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 35 ℃; 进样量 2 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取芥子碱硫氰酸盐 4.00 mg、虎杖苷 2.95 mg、野黄芩苷 3.48 mg、白藜芦醇 4.85 mg、黄芩苷 5.64 mg、大黄素-8-*O*-β-葡萄糖苷 2.00 mg、黄芩素 3.10 mg、汉黄芩素 2.08 mg 适量, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释

至刻度, 得各个对照品储备液, 备用。再精密吸取各对照品储备液适量置 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 得含芥子碱硫氰酸盐 80.0 mg/L、虎杖苷 59.0 mg/L、野黄芩苷 69.6 mg/L、白藜芦醇 48.5 mg/L、黄芩苷 112.8 mg/L、大黄素-8-*O*-β-葡萄糖苷 20.0 mg/L、黄芩素 31.0 mg/L、汉黄芩素 10.4 mg/L 的混合对照品储备液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取金欣口服液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜(0.22 μm)滤过, 备用。

2.3 系统适用性试验

取供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件进样, 结果 8 种被测定成分均能达到基线分离, 与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 以各成分色谱峰计算理论塔板数均超过 60 000, 峰形较好。UPLC 图见图 1。

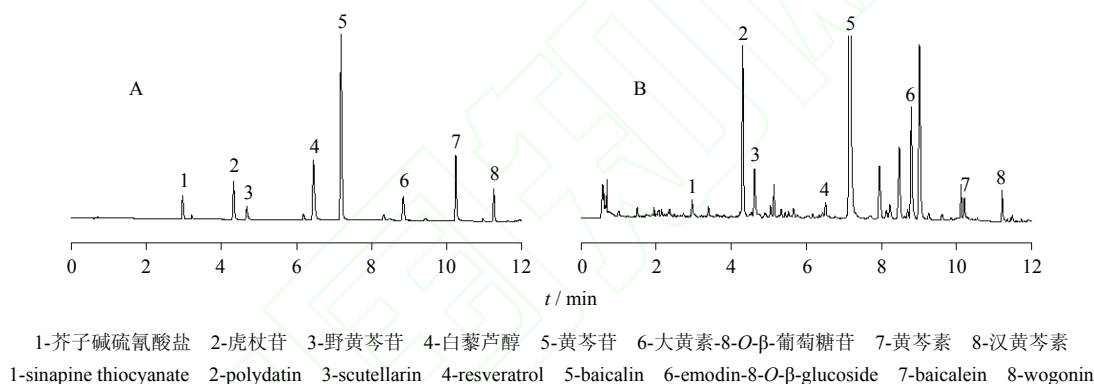


图 1 8 种混合对照品 (A) 与金欣口服液 (B) 的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of eight mixed reference substances (A) and Jinxin Oral Liquid (B)

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 0.10、0.25、0.5、1.0、2.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 与混合对照品储备液一起得系列混合对照品溶液。分别吸取上述溶液各 2 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样, 记录色谱峰峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 对照品质量浓度为横坐标(X) 进行线性回归, 得回归方程: 芥子碱硫氰酸盐 $Y=3\,328.2\,X-978.14$, $r=0.999\,1$, 线性范围 0.8~80.0 mg/L; 虎杖苷 $Y=7\,706.1\,X-895.1$, $r=0.999\,2$, 线性范围 0.59~59.0 mg/L; 野黄芩苷 $Y=2\,121.2\,X-334.78$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.696~69.6 mg/L; 白藜芦醇 $Y=20\,810\,X-10\,787$, $r=0.999\,1$, 线性范围 0.485~48.5 mg/L; 黄芩苷 $Y=21\,308\,X-6\,088.4$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.128~112.8 mg/L; 大黄素-8-*O*-β-葡萄糖苷 $Y=15\,258\,X-703.6$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.2~

20.0 mg/L; 黄芩素 $Y=23\,223\,X-9\,421.4$, $r=0.999\,4$, 线性范围 0.31~31.0 mg/L; 汉黄芩素 $Y=30\,587\,X-1\,625.6$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.104~10.4 mg/L。

2.5 精密度试验

取一定质量浓度的混合对照品溶液(含芥子碱硫氰酸盐 8.0 mg/L、虎杖苷 5.9 mg/L、野黄芩苷 6.96 mg/L、白藜芦醇 4.85 mg/L、黄芩苷 11.28 mg/L、大黄素-8-*O*-β-葡萄糖苷 2.0 mg/L、黄芩素 3.1 mg/L、汉黄芩素 1.04 mg/L), 在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 计算芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、野黄芩苷、白藜芦醇、黄芩苷、大黄素-8-*O*-β-葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.21%、0.89%、2.03%、1.84%、1.67%、2.84%、2.81%、2.11%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、

24 h 按“2.1”色谱条件测定,记录色谱峰面积。结果芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、野黄芩苷、白藜芦醇、黄芩苷、大黄素-8-*O*- β -葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.12%、2.45%、1.74%、1.93%、2.81%、2.02%、1.51%、2.62%,说明供试品溶液中的 8 种指标成分在室温条件下 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批(批号 20110615)样品 6 份,按“2.2.2”项下方法操作,平行制备供试品溶液 6 份,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰面积,结果芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、野黄芩苷、白藜芦醇、黄芩苷、大黄素-8-*O*- β -葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素质量浓度的 RSD 分别为 2.81%、0.40%、1.14%、1.27%、0.53%、0.82%、1.68%、0.52%。

2.8 加样回收率试验

取同一批号已测定的金欣口服液 6 份(批号

20110615),每份约 0.5 mL,精密吸取,分别精密加入对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰峰面积,计算回收率。结果芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、野黄芩苷、白藜芦醇、黄芩苷、大黄素-8-*O*- β -葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素的平均回收率分别为 100.03%、100.58%、101.12%、99.70%、101.49%、101.26%、100.59%、100.22%,RSD 分别为 1.80%、1.57%、1.98%、2.33%、1.68%、1.63%、2.71%、3.03%。

2.9 样品测定

取 3 批金欣口服液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批平行 3 份,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰面积,每份进样 2 次,计算每批样品中 8 种指标成分的质量浓度,结果见表 2。

3 讨论

本实验建立了 UPLC 法同时测定金欣口服液中

表 1 金欣口服液中 8 种指标成分的测定结果 (n=3)
Table 1 Determination of eight index components in Jinxin Oral Liquid (n=3)

批 号	质量浓度 / (mg·L ⁻¹)							
	芥子碱硫氰酸盐	虎杖苷	野黄芩苷	白藜芦醇	黄芩苷	大黄素-8- <i>O</i> - β -葡萄糖苷	黄芩素	汉黄芩素
20110318	247.8	1 193.3	1 201.2	22.8	2 560.2	488.0	51.2	46.2
20110615	245.4	1 192.3	1 197.8	22.8	2 551.2	485.3	51.5	46.1
20110929	235.3	1 188.7	1 176.4	23.1	2 572.4	493.0	50.4	46.2

8 种指标成分的方法,由于采用 1.7 μ m 的 C₁₈ 填料色谱柱,因此具有较高的通量,而且也具有较好的准确度、精密度和可靠性,方法简便,分析时间短,尤其适用于中药复方多指标成分的定量检测^[5]。

应用同一测定方法检测多个指标成分时,分析方法研究过程中检测波长的选择以及流动相的确定非常关键。本实验分别对 8 种指标成分进行紫外全波长扫描,确定了各成分的最大吸收波长,芥子碱硫氰酸盐 326 nm,虎杖苷 306 nm,野黄芩苷 335 nm,白藜芦醇、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 280 nm,大黄素-8-*O*- β -葡萄糖苷 420 nm。经过多次实验,发现在 280 nm 检测波长下,8 种指标成分灵敏度较高,峰形较好。在此基础上,考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液等流动相系统,结果显示,采用乙腈-0.1%甲酸水溶液系统为流动相时,色谱图基线

平稳,金欣口服液中 8 种指标成分分离效果较好。

参考文献

[1] Yang Y, Wang S C, Bai W J, *et al.* Evaluation by survival analysis on effect of traditional Chinese medicine in treating children with respiratory syncytial viral pneumonia of phlegm-heat blocking Fei syndrome [J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(2): 95-100.

[2] 李江全, 任现志, 汪受传. 清肺口服液对免疫功能影响的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 47-48.

[3] 汪受传, 王 霖, 陈 超, 等. 清肺口服液含药血浆对呼吸道合胞病毒抑制作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 25-27.

[4] 汪受传, 韩新民, 李江全, 等. 一种治疗小儿病毒性肺炎的清肺口服液制剂及其制备方法: 中国, CN1456341A [P]. 2003-11-19.

[5] 吴剑威, 赵润怀, 陈 波, 等. 超高效液相色谱在中药领域的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 79-81.